



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07H 19/16, G01N 33/15</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/48903</p> <p>(43) 国際公開日 1999年9月30日(30.09.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01459</p> <p>(22) 国際出願日 1999年3月23日(23.03.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/96799 1998年3月24日(24.03.98) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 松田 彰(MATSUDA, Akira)[JP/JP] 〒001-0024 北海道札幌市北区北24条西12-1-7-501 Hokkaido, (JP) 中田裕康(NAKATA, Hiroyasu)[JP/JP] 〒342-0041 埼玉県吉川市大字保767-11 Saitama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 斉藤佳子(SAITOH, Yoshiko)[JP/JP] 〒183-0042 東京都府中市武蔵台3-13-4 プラムハウス203 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 廣瀬孝美(HIROSE, Takayoshi) 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満5丁目13番3号 高橋ビル北3号館6階 Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: ADENOSINE DERIVATIVE</p> <p>(54) 発明の名称 アデノシン誘導体</p> <p>(57) Abstract An adenosine derivative acting selectively on P3-like receptor (purine receptor 3-like substance). Because of being capable of binding selectively to P3-like receptor, this adenosine derivative is usable in screening P3-like receptor and substances having the action thereof and, in its turn, useful in studying pharmacological, biochemical and physiological effects and mechanisms of purine receptors.</p>		

(57)要約

P 3 様受容体（プリン受容体 3 様物質）に選択的に結合する作用を有するアデノシン誘導体を提供する。本発明のアデノシン誘導体は、P 3 様受容体と選択的に結合することができるので、P 3 様受容体及び当該作用を有する物質のスクリーニングに利用することができ、ひいてはプリン受容体の薬理学的、生化学的、生理学的な作用・機構の研究に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EES	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## アデノシン誘導体

## 5 技術分野

本発明は新規なアデノシン誘導体に関する。より詳細には、プリン受容体3様物質と結合し得るアデノシン誘導体に関する。

## 従来の技術

10 アデノシン 5'-三リン酸(Adenosine 5'-triphosphate, ATP)は1929年に発見され、生体のエネルギーの源泉になっている物質であり、その細胞内における生化学的な重要性は過去何年にもわたり認識されている。その細胞内の働きに加えて、最近の十年でその細胞表面に置ける受容体を介した細胞外の作用についての知見が蓄積されつつある(N.Y. Acad. Sci. 6  
15 03, 1-17, 1990)。

ATPはその生理的作用をプリン(purine)受容体を介して発現する (Receptor & Channel, 3, 283-289, 1995)。その受容体の分類は、主としてP1受容体及びP2受容体に分かれ、いずれも細胞外のアデニンヌクレオチドが結合すると言われている。また、その生体内の結合性物質(リガンド)としては、P1についてはアデノシン、P2についてはATP及びADPが知られている。そのため、P1受容体は通常アデノシン受容体とよばれ、アデノシンに選択的に結合し、サブクラスとして、A1, A2, A3に分類される。A1とA3受容体はG<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>蛋白と結合してadenylate cyclase活性の抑制に関与する。一方、A2受容体はG<sub>s</sub>蛋白と結合することにより、adenylate cyclase活性の刺激を行う。  
25

さらに、近年では、P2受容体のサブタイプが薬理学、電気生理学、分子生物学を基盤として同定されてきている。即ち、P2受容体はP2X(Ligand Gated), P2Y, U, Z(G蛋白結合性)のプリン受容体ファミリーに分類される(pharmacol. rev. 46, 143-156, 1994)。例えば、神経系で言えば、ATP  
30 はプリン受容体の中のP2xサブタイプに働き、ニューロンや平滑筋細胞を含んだ幅広い細胞へのイオン運搬の増加作用を示す(Trends, Pharmacol. Sci. 16, 168-174)。このP2x受容体については、近年、ラットにて6種

のp2xのプリン受容体のサブタイプがクローニングされてきている。

このように、プリン受容体は大きくP1受容体とP2受容体とに大別され、さらに細分化されている。

上記のP1受容体、特にアデノシン拮抗剤については、近年、抗パーキンソン病の治療薬や腎不全への治療剤など、多くの試みがなされている。また、P2受容体については、たとえばP2X受容体とATPの結合はニューロンに置ける交感神経伝達に深く関与している。また、P2X1の場合はニューロンと平滑筋間での上記伝達に関与している。したがって、そのリガンドの臨床応用としては神経系の疾患、頻尿、鎮痛剤等が考慮されている。

上述のように、従来P1及びP2受容体は医薬などへの応用が検討されているが、1993年に従来P1及びP2受容体と異なる第三の受容体が提唱されている。本受容体は、ラットの動脈の交感神経に局在しており、プリン受容体3様物質(以下、P3様受容体という)と称され、種々のヌクレオシド、ヌクレオチドにより活性化することが知られている。その相対的効力の強さとしては2-chloroadenosine>beta, gamma-methylene-ATP>ATP>Adenosineであり、また、別の報告では、平滑筋弛緩作用の効力ではNECA>Adenosine>ATP=ADP=AMP=inosineと報告されている (Naunyn-schmiedberg's arch.pharmacol, 338, 221-227, 1988; J. Pharmacol. 46, 337-341; Gen. Pharmacol. 23, 1067-1071, 1992)。

係るP3様受容体は従来P1及びP2受容体と異なるので、P3様受容体へ選択的に親和性を有する化合物は、プリン受容体の薬理的、生化学的、生理学的の研究及び上記臨床応用への可能性が大きいと考えられている。

発明者らは従来、前記A1アデノシン受容体の精製を各種の原料より手がけてきている (J. Biol. Chem. 264, 16545-16551, 1989; Eur. J. Biochem. 206, 171-177, 1992)。

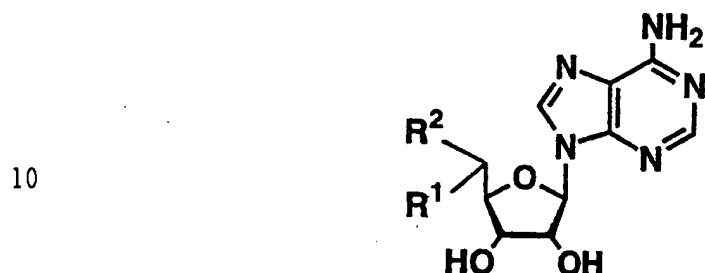
その一連の研究の中で、非選択的アデノシン受容体アゴニストであり、ラットの脳内におけるユニークなリガンドであるNECA(5'-N-ethylcarboxamidoadenosine)に親和性のある新規な結合性蛋白質を発見し、上記P1及びP2と異なる性質を持つこと；リガンドへの結合性を始めとして、上述のP3様受容体と類似していることを見い出している (Biochem & Biophysical Research Com, 219, 469-474, 1996)。

本発明者らはその研究を鋭意継続することにより、上記P3様受容体を選

択的に結合する物質を見出し本発明を完成した。即ち、本発明は、P3様受容体に結合し得る物質を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

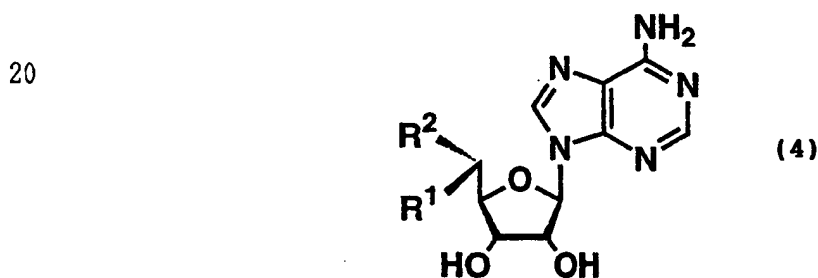
5 本発明に係るP3様受容体に結合し得る物質は、下記一般式で示されるアデノシン誘導体である。



(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は水酸基又は低級アルキニル基を示す。但し、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>の一方が低級アルキニル基のとき、他方は水酸基であり；またR<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>の一方が水酸基のとき、他方は低級アルキニル基である)

15

上記一般式で示される本発明の化合物において、好適な化合物は下記一般式(4)で示される化合物である。特に、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>の一方が水酸基、他方がエチニル基又は1-ヘキシニル基である化合物が好ましい。



25 (式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は前記と同じ)

また、本発明のプリン受容体3様物質のスクリーニング方法は上記一般式で示されるアデノシン誘導体を用いることを特徴とするものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

30 本発明のアデノシン誘導体は上記の一般式で表され、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>で示される低級アルキニル基としては、例えば、エチニル基、プロピニル基、ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基などが例示され、好ましくはエチ

ニル基又は1-ヘキシニル基が例示される。

本発明の化合物は分子内の不斉炭素に基づく光学異性体が存在するが、  
係る異性体及びそれらの混合物は何れも本発明の範囲に包含されるもので  
ある。また、本発明のアデノシン誘導体にはその塩が包含され、係る塩と  
5 しては、例えば塩酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の酸付加塩が例示される。

上記の一般式で示される本発明のアデノシン誘導体は種々の方法で得る  
ことができるが、例えば、後記実施例に示されるように、下記の反応工程  
式に示される方法にて合成することができる。

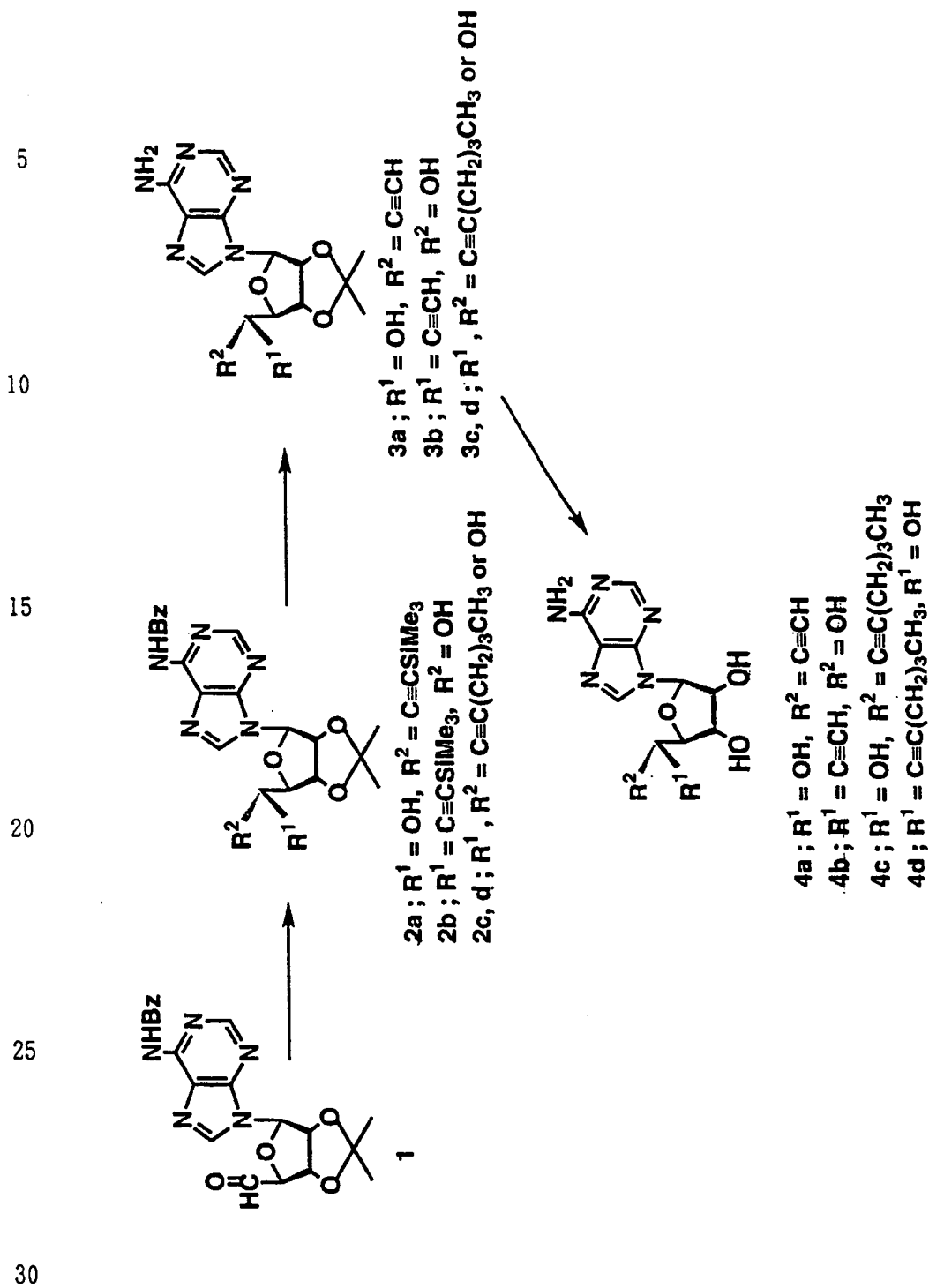
10

15

20

25

30



また、本発明のプリン受容体3様物質のスクリーニング方法は、前記一般式で示されるアデノシン誘導体を用いることを特徴とするものであり、より具体的には、後記試験例に示される方法に準じて実施することができる。

5

#### 産業上の利用可能性

本発明のアデノシン誘導体は、後記試験例に示されるように、P3様受容体と選択的に結合することができるので、P3様受容体及び当該作用を有する物質のスクリーニングに利用することができ、ひいてはプリン受容体の薬理学的、生化学的、生理学的な作用・機構の研究に有用である。また、本発明のアデノシン誘導体は医薬（例えば、血圧降下剤等）としての応用も期待できる。

10

#### 実施例

以下、実施例及び試験例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

15

##### 実施例1（化合物2a及び2bの合成）

N<sup>6</sup>-ベンゾイル-9-(2,3-0-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-7-C-トリメチルシリル-b-D-アロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (2a)及びN<sup>6</sup>-ベンゾイル-9-(2,3-0-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-7-C-トリメチルシリル-a-L-タロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (2b) [N<sup>6</sup>-Benzoyl-9-(2,3-0-isopropylidene-6,7-dideoxy-7-C-trimethylsilyl-b-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (2a)及びN<sup>6</sup>-Benzoyl-9-(2,3-0-isopropylidene-6,7-dideoxy-7-C-trimethylsilyl-a-L-talo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (2b)]

20

25

EtMgBr (3 M THF溶液, 5.62 mL)を、トリメチルシリルアセチレン(trimethylsilyl acetylene)(2.54 mL)を含むTHF溶液(20 mL)にアルゴン雰囲気下10 °Cで加え、同温で2時間攪拌した。化合物1 (2.30 g, 5.62 mmol)のTHF溶液(30 mL)を上記の溶液に-20 °Cで滴下し、同温で2時間攪拌した。反応液にNH<sub>4</sub>Cl水溶液(1 M)を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。有機層を濃縮乾固し、残渣をシリカゲルカラムにより精製し、2a (1.24 g)、2b (461 mg)及び2aと2bの混合物(282 mg)を白色泡状物質と

30



して得た。

2aと2bの混合物 : EI-MS, m/z 507 ( $M^+$ )

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm, 8.83 and 8.78 (each s, 1H, H2), 8.27 and 8.20 (each s, 1H, H8), 8.04 and 7.63 (m, total 5H, Ph), 6.05 and 5.97 (each d, 1H, H-1',  $J = 4.4, 4.8$  Hz), 5.20 and 5.18 (each d, 1H, H-2'), 4.76 (d, 1H, H4'), 1.68, 1.42, 1.65, and 1.38 (each s, 3H, Me), 0.22 and 0.12 (s, 9H, TMS)

## 実施例 2 (化合物 3a及びbの合成)

① 9-(2,3-0-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-b-D-アロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (3a) [9-(2,3-0-Isopropylidene-6,7-dideoxy-b-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (3a)]

化合物2a (1.24 g)をメタノール性アンモニア(0 °Cで飽和, 40 mL)に溶解し、室温で26時間攪拌した。析出した結晶をろ過し化合物3aを1.95 g(80%)を得た。

mp 257-258.5 °C (MeOHから再結晶)

EI-MS, m/z 331 ( $M^+$ )

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm, 8.31 (s, 1H, H2), 8.15 (s, 1H, H8), 7.36 (br s, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 6.29 (d, 1H, 5'-OH,  $J = 4.9$  Hz), 6.16 (d, 1H, H1',  $J = 3.3$  Hz), 5.30 (dd, 1H, H2',  $J = 3.3, 6.0$  Hz), 5.07 (dd, 1H, H3',  $J = 1.7, 6.0$  Hz), 4.41 (ddd, 1H, H5',  $J = 2.2, 4.9$  Hz), 4.18 (dd, 1H, H4',  $J = 2.2, 1.7$  Hz), 3.38 (dd, 1H, -C $\equiv$ CH,  $J = 2.0$  Hz)

元素分析  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$ として:

計算値: C, 54.38; H, 5.17; N, 21.14

実測値: C, 54.33; H, 5.10; N, 21.07

② 9-(2,3-0-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-a-L-タロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (3b) [9-(2,3-0-Isopropylidene-6,7-dideoxy-a-L-talo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (3b)]

化合物2b (458 mg)をメタノール性アンモニア(0 °Cで飽和, 40 mL)に溶解し、室温で26時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮すると白色結晶が析出し、結晶をろ過し化合物3bを260 mg (87%)を得た。

mp 232-234 °C (MeOHから再結晶)

EI-MS,  $m/z$  331 ( $M^+$ )

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm, 8.33 (s, 1H, H2), 8.15 (s, 1H, H8), 7.36 (br s, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 6.17 (d, 1H, H1',  $J = 2.8$  Hz), 6.06 (d, 1H, 5'-OH,  $J = 6.6$  Hz), 5.29 (dd, 1H, H2',  $J = 2.8, 6.0$  Hz), 5.01 (dd, 1H, H3',  $J = 3.3, 6.0$  Hz), 4.42 (ddd, 1H, H5',  $J = 2.2, 6.1, 6.6$  Hz), 4.16 (dd, 1H, H4',  $J = 3.3, 6.1$  Hz), 3.39 (dd, 1H,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $J = 2.0$  Hz).

元素分析  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_4 \cdot 0.25 \text{H}_2\text{O}$ として:

計算値: C, 53.65; H, 5.18; N, 20.85

実測値: C, 53.73; H, 5.10; N, 20.85.

### 実施例3 (化合物4a及びbの合成)

#### ① 9-(6,7-ジデオキシ-b-D-アロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (4a)

[9-(6,7-Dideoxy-b-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (4a)]

化合物3a (623 mg)を90%トリフルオロ酢酸(20 mL)に溶解し、室温で10分間攪拌した。反応液を減圧下留去し、エタノールで数回共沸した。残渣をシリカゲルカラムで精製し、エタノールから結晶化し化合物4aを431 mg (79%)得た。

mp 242-243 °C

EI-MS,  $m/z$  291 ( $M^+$ )

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm, 8.29 (s, 1H, H2), 8.13 (s, 1H, H8), 7.40 (br s, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 6.58 (d, 1H, 5'-OH,  $J = 3.3$  Hz), 5.90 (d, 1H, H1',  $J = 7.7$  Hz), 5.45 (d, 1H, 2'-OH,  $J = 7.1$  Hz), 5.33 (d, 1H, 3'-OH,  $J = 3.9$  Hz), 4.65 (ddd, 1H, H2',  $J = 7.1, 7.7$  Hz), 4.48 (m, 1H, H5',  $J = 2.2, 3.3, 3.9$  Hz), 4.21 (dd, 1H, H3',  $J = 3.9$  Hz), 3.98 (dd, 1H, H4',  $J = 3.9$  Hz), 3.40 (dd, 1H,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $J = 2.2$  Hz)

元素分析  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_4 \cdot 0.25 \text{H}_2\text{O}$ として:

計算値: C, 48.73; H, 4.60; N, 23.68

実測値: C, 48.94; H, 4.60; N, 23.38.

#### ② 9-(6,7-ジデオキシ-a-L-タロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (4b)

[9-(6,7-Dideoxy-a-L-talo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (4b)]

化合物3b (251 mg)を90%トリフルオロ酢酸(8 mL)に溶解し、室温で10

分間攪拌した。反応液を減圧下留去し、エタノールで数回共沸した。残渣をシリカゲルカラムで精製し、エタノールから結晶化し化合物4bを213 mg (97%)得た。

mp 214-215.5 °C

5 EI-MS, m/z 291 (M<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm, 8.33 (s, 1H, H2), 8.16 (s, 1H, H8), 7.45 (br s, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 5.92 (d, 1H, H1', J = 7.2 Hz), 5.48 (d, 1H, 2'-OH, J = 2.2 Hz), 5.31 (d, 1H, 3'-OH, J = 3.3 Hz), 4.63 (ddd, 1H, H2', J = 7.1, 2.2 Hz), 4.49 (dd, 1H, H5', J = 2.2, 3.8 Hz), 4.13 (d, 1H, H3', J = 1.7, 3.3 Hz), 3.96 (dd, 1H, H4', J = 1.7, 3.9 Hz), 3.32 (dd, 1H, -C≡CH, J = 2.2 Hz)

元素分析 C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>として:

計算値: C, 49.48; H, 4.50; N, 24.04

実測値: C, 49.30; H, 4.60; N, 23.88.

15

実施例4 (化合物3c及びdの合成)

① N<sup>9</sup>-ベンゾイル-9-(7-C-ブチル-2,3-0-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-b-D-アロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (2c), N<sup>9</sup>-ベンゾイル-9-(7-C-ブチル-2,3-0-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-a-L-タロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (2d)及び9-(7-C-ブチル-2,3-0-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-b-D-アロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (3c) 及び9-(7-C-ブチル-2,3-0-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-a-L-タロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (3d) [N<sup>9</sup>-Benzoyl-9-(7-C-butyl-2,3-0-isopropylidene-6,7-dideoxy-b-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (2c), N<sup>9</sup>-Benzoyl-9-(7-C-butyl-2,3-0-isopropylidene-6,7-dideoxy-a-L-talo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (2d)及び9-(7-C-butyl-2,3-0-isopropylidene-6,7-dideoxy-b-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (3c), 及び9-(7-C-butyl-2,3-0-isopropylidene-6,7-dideoxy-a-L-talo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (3d)]

30 EtMgBr (3 M THF溶液, 17.7 mL)を、n-ヘキシシ(n-hexyne) (6.1 mL)を含むTHF溶液(20 mL)にアルゴン雰囲気下10 °Cで加え、同温で3時間攪拌した。化合物1 (2.17 g, 5.31 mmol)のTHF溶液(50 mL)を上記の溶液に-2

0 °Cで滴下し、20 °Cで4時間攪拌した。反応液にNH<sub>4</sub>Cl水溶液(1 M)を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。有機層を濃縮乾固し、残渣をシリカゲルカラムにより精製し、2cと2dの混合物を白色泡状物質として632 mg及び3cと3dの混合物を白色泡状物質として819 mg得た。

5 2cと2dの混合物 : EI-MS, m/z 491 (M<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm, 8.83 and 8.78 (each s, 1H, H<sub>2</sub>), 8.22 and 8.17 (each s, 1H, H<sub>8</sub>), 8.05 and 7.53 (each m, total 5H, Ph), 6.04 and 5.97 (each d, 1H, H-1', J = 4.4, 4.8 Hz), 5.20 (m, 2H, H<sub>2</sub>', H<sub>3</sub>') , 4.73 (dd, 1H, 5'-OH), 1.68, 1.42, 1.65, and 1.38 (each s, 3H, Me)  
10 , 1.25 (m, total 14H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.90 (m, total 3H, Me)

② 9-(7-C-ブチル-2,3-O-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-b-D-アロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (3c), 及び9-(7-C-ブチル-2,3-O-イソプロピリデン-6,7-ジデオキシ-a-L-タロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (3d) [9-(7-C-butyl-2,3-O-isopropylidene-6,7-dideoxy-b-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (3c), 及び9-(7-C-butyl-2,3-O-isopropylidene-6,7-dideoxy-a-L-talo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (3d)]  
15

化合物2cと2dの混合物 (800 mg)をメタノール性アンモニア(0 °Cで飽和, 30 mL)に溶解し、室温で20時間攪拌した。溶媒を留去した後、残渣をシリカゲルカラムにより精製し、3cと3dの混合物を白色泡状物質として527 mg  
20 (84%)得た。

EI-MS, m/z 388 (M+H<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm, 8.31 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 8.14 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7.36 (br s, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 6.13 (d, 2H, 5'-OH, H<sub>1</sub>', J = 3.3 Hz), 5.27 (dd, 1H, H<sub>2</sub>', J = 3.3, 6.0 Hz), 5.04 (dd, 1H, H<sub>3</sub>', J = 1.6, 6.0 Hz),  
25 4.38 (dd, 1H, H<sub>4</sub>', J = 1.6 Hz), 4.16 (ddd, 1H, H<sub>5</sub>'), 2.16 (m, total 2H, CH<sub>2</sub>), 1.48 and 1.33 (each s, 3H, Me), 1.33 (m, total 14H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.84 (m, total 3H, Me)

元素分析 C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>として:

計算値 : C, 58.90; H, 6.50; N, 18.08

30 実測値 : C, 58.77; H, 6.41; N, 17.93

実施例 5 (化合物 4 c 及び d の合成)

9-(7-C-ブチル-6,7-ジデオキシ-b-D-アロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (4c)及び9-(7-C-ブチル-6,7-ジデオキシ-a-L-タロ-ヘプト-5-イノフラノシル)アデニン (4d) [9-(7-C-butyl-6,7-dideoxy-b-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (4c)及び9-(7-C-butyl-6,7-dideoxy-a-L-talo-hept-5-ynofuranosyl)adenine (4d)]

化合物3cと3dの混合物 (1.86 g)を90%トリフルオロ酢酸(20 mL)に溶解し、室温で40分間攪拌した。反応液を減圧下留去し、エタノールで数回共沸した。残渣をシリカゲルカラムで精製し、部分精製された4c (765 mg)及び4d (205 mg)並びにその混合物(208 mg)得た。化合物4c及び4dはさらに逆層C-18 HPLCにより精製した。

①化合物4c

mp 124-126 °C

EI-MS, m/z 348 (M+H<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm, 8.31 (s, 1H, H2), 8.15 (s, 1H, H8), 7.55 (br s, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 5.90 (d, 1H, H1', J = 7.3 Hz), 5.35 (m, 2H, 2', 3'-OH), 4.63 (ddd, 1H, H2', J = 7.3, 5.5 Hz), 4.44 (dd, 1H, H5', J = 1.5, 3.7 Hz), 4.21 (d, 1H, H3', J = 5.1 Hz), 3.95 (dd, 1H, H4', J = 1.5, 3.3 Hz)

元素分析 C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> · 5/4 H<sub>2</sub>Oとして:

計算値: C, 51.95; H, 6.40; N, 18.83

実測値: C, 51.98; H, 6.10; N, 18.63

②化合物4d

mp 113-116 °C

EI-MS, m/z 348 (M+H<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm, 8.31 (s, 1H, H2), 8.14 (s, 1H, H8), 7.38 (br s, 2H, 6-NH<sub>2</sub>), 5.90 (d, 1H, H1', J = 7.0 Hz), 5.43 (br s, 1H, 2'-OH), 5.25 (br s, 1H, 3'-OH), 4.64 (d, 1H, H2', J = 7.0 Hz), 4.45 (br s, 1H, H5'), 4.13 (br s, 1H, H3'), 3.91 (dd, 1H, H4')

元素分析 C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>として:

計算値: C, 55.32; H, 6.09; N, 20.16

実測値: C, 55.03; H, 6.39; N, 19.87

## 試験例 1

P 3 様受容体の精製

J. Biol. Chem., 264, 16545-16551 (1989)に記されている方法と同様の方法でラット脳の膜画分を調製し、0℃にて10倍量の0.4% CHAPSを含む  
5 50 mM トリス酢酸緩衝液 (pH7.2) と混合することにより、膜タンパク質を可溶化した。40,000 x g にて1時間遠心分離した後、上清を集め、0.1M 塩化ナトリウム及び0.1% CHAPSを含む50mM トリス酢酸緩衝液 (pH7.2) であらかじめ平衡化したヒドロキシアパタイト カラムに添加した。0.1M 塩化ナトリウム及び0.1% CHAPSを含む0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) で  
10 カラムを洗浄した後、0.1Mから0.5Mのリン酸カリウム濃度勾配により吸着したタンパク質を溶出した。P 3 様受容体活性の測定はトリチウムラベルされたNECAを用い、Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 469-474 (1996)に記されている方法によって測定した。P 3 様受容体を含む画分を集め、限外濾過器を用いて2.3倍に濃縮して以下の実験に用いた。最終的に  
15 得られた精製標品は約2.7pmol/mg蛋白質のP 3 様受容体活性を有する。

## 試験例 2

本発明化合物による結合阻害実験

本発明の化合物のプリン受容体結合阻害実験を以下の方法にて行った。

20 ① P 3 様受容体のNECA結合活性に対する試験化合物の阻害効果はBiochem. Biophys. Res. Commun., 219, 469-474 (1996)に記されている方法に準じて調べた。即ち、0.1% CHAPS、4mM塩化マグネシウム、種々の濃度(1nM-100μM)の試験化合物(一般式(4a)で示される本発明の化合物、以下同様)及び32nMのトリチウムラベルされたNECAを含む50mM トリス酢酸緩衝液 (pH7.2) 中に、精製したP 3 様受容体0.12pmolを加え、0℃  
25 で15時間インキュベートした。反応液を0.3%ポリエチレンイミンで前処理したフィルター(Whatman GF/B)で濾過することにより反応を終了した。このフィルターを50mM トリス酢酸緩衝液 (pH7.2) で3回洗浄した後、バイアルに移し、5mlのアクアゾル(Aquasol)を加えて液体シンチレーションカウンターでトリチウムのカウントを測定した。Ki値は、コンピュータープログラムのGraph Pad Prismを用いて計算した。試験化合物のP 3  
30 様受容体のNECA結合活性に対するKiは19nMと求められた。

- ② A1及びA2a アデノシン受容体のリガンド結合活性測定には、J. Biol. Chem., 264, 16545-16551(1989)に記されている方法で調製したラット脳の膜画分を用いた。A1 アデノシン受容体の活性測定には0.18mg、A2a アデノシン受容体の活性測定には0.55mgの膜画分を用いた。A1 アデノシン受容体のリガンドには2.0nMのトリチウムラベルされたDPCPX (8-[4-[[[2-aminoethyl)amino]carbonyl]methyl]phenyl]-1,3-diprocyclopentyltheophylline)、A2a アデノシン受容体には5.9nMのトリチウムラベルされたCGS 21680を用い、上記と同様の方法で結合活性を測定した。試験化合物は0.1μM以下の濃度でA1 アデノシン受容体のDPCPX結合活性を阻害せず(Ki; 12μM)、A2a アデノシン受容体のCGS 21680結合活性は100μMでも約40%しか阻害しなかった。
- ③ A3 アデノシン受容体のリガンド結合活性測定にはRBL-2H3細胞から調製した膜画分0.27mgを用いた。0.1% CHAPS、4mM 塩化マグネシウム、2U/ml アデノシンデアミナーゼ及び種々の濃度(10nM-100μM)の試験化合物を含む50mM トリス酢酸緩衝液(pH7.2)に100nM DPCPXと100μM AppNHp (adenylylimidodiphosphate)を加えた反応液(A)と、10nM IB-MECA (N<sup>6</sup>-(3-iodobenzyl)-5'-N-methylcarbamoyladenosi-  
ne)、100nM DPCPX及び100μM AppNHpを加えた反応液(B)それぞれに0.15nMの<sup>125</sup>IラベルされたAB-MECA (N<sup>6</sup>-(4-amino-3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide)を加えて25℃で2時間インキュベートした。それ以外の条件は上記の方法に準じた。A3 アデノシン受容体に由来するAB-MECA結合量は反応液Aと反応液Bそれぞれから得られた結合活性の差から計算した。試験化合物はいずれの濃度でも、A3 アデノシン受容体のAB-MECA結合活性を全く阻害しなかった。
- ④ A2b アデノシン受容体の活性測定には、VA-13細胞を用い、試験化合物を加えた時の細胞内cAMP濃度の変化を調べた。24ウェルプレート中で100,000細胞/ウェルの濃度で2日間培養し、細胞を118mM 塩化ナトリウム、4.7mM 塩化カリウム、1.2mM 塩化マグネシウム、1.5mM 塩化カルシウム、1.2mM リン酸二水素カリウム、0.5mM EDTA及び10mM グルコースを含む20mM HEPES緩衝液(pH7.4)で洗浄した。つぎに0.1mM Ro-20-1724と2ユニット/ml アデノシンデアミナーゼを含む同

緩衝液を加えて37℃で10分間プレインキュベートした後、種々の濃度(0-100  $\mu$ M)の試験化合物を含む同緩衝液を加えて37℃で10分間インキュベートした。緩衝液を除去し、0.1M 塩酸を添加して反応を停止させた。1M水酸化ナトリウムで中和させた後、氷冷した65%(v/v)エタノールで2  
5 回抽出し、乾固させてからエンザイムイムノアッセイによりcAMPを定量した。試験化合物はいずれの濃度でもA2bアデノシン受容体によるcAMP濃度の上昇を誘起しなかった。また、A2bアデノシン受容体アゴニスト(NECA)によるcAMP濃度上昇を阻害しなかった。  
⑤ 以上の結果から、本発明の化合物はP3様受容体と特異的に結合し得  
10 る物質であることが明らかとなった。

15

20

25

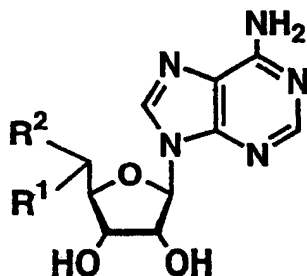
30



## 請求の範囲

1. 下記一般式で示されるアデノシン誘導体。

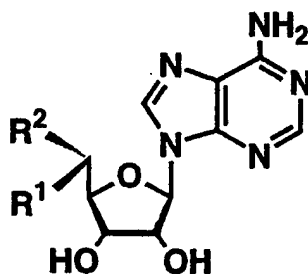
5



10 (式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は水酸基又は低級アルキニル基を示す。但し、 $R^1$  及び  $R^2$  の一方が低級アルキニル基のとき、他方は水酸基であり；また  $R^1$  及び  $R^2$  の一方が水酸基のとき、他方は低級アルキニル基である)

2. 下記一般式で示される請求の範囲1記載のアデノシン誘導体。

15



20 (式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は前記と同じ)

3.  $R^1$  及び  $R^2$  の一方が水酸基であり、他方がエチニル基又は1-ヘキシニル基である請求の範囲1記載のアデノシン誘導体。

4. 請求の範囲1記載の化合物を用いるプリン受容体3様物質のスクリーニング方法。

25

30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01459

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C07H19/16, G01N33/15											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C07H19/16, G01N33/15											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), REGISTRY (STN)											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX/ PA</td> <td>MATSUDA A., et al., "Nucleosides and Nucleotides. 177, 9-(6,7-Dideoxy-β-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine: A Selective and Potent Ligand for P<sub>3</sub> Purinoceptor-like Protein", J. Med. Chem., Vol. 41, No. 15 (July 16, 1998) p.2676-2678</td> <td>1-3/ 4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SHINOZUKA K., et al., "Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery", Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol. 338 (1988) p.221-227</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	PX/ PA	MATSUDA A., et al., "Nucleosides and Nucleotides. 177, 9-(6,7-Dideoxy-β-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine: A Selective and Potent Ligand for P <sub>3</sub> Purinoceptor-like Protein", J. Med. Chem., Vol. 41, No. 15 (July 16, 1998) p.2676-2678	1-3/ 4	A	SHINOZUKA K., et al., "Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery", Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol. 338 (1988) p.221-227	1-4
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
PX/ PA	MATSUDA A., et al., "Nucleosides and Nucleotides. 177, 9-(6,7-Dideoxy-β-D-allo-hept-5-ynofuranosyl)adenine: A Selective and Potent Ligand for P <sub>3</sub> Purinoceptor-like Protein", J. Med. Chem., Vol. 41, No. 15 (July 16, 1998) p.2676-2678	1-3/ 4									
A	SHINOZUKA K., et al., "Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery", Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol. 338 (1988) p.221-227	1-4									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 15 June, 1999 (15. 06. 99)		Date of mailing of the international search report 29 June, 1999 (29. 06. 99)									
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer									
Facsimile No.		Telephone No.									

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01459

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C07H19/16, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C07H19/16, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX/ PA	MATSUDA A., et al., "Nucleosides and Nucleotides. 177. 9-(6,7-Dideoxy-β-D- <i>allo</i> -hept-5-ynofuranosyl)adenine: A Selective and Potent Ligand for P <sub>3</sub> Purinoceptor-like Protein", J. Med. Chem., Vol. 41, No. 15 (July 16, 1998) p. 2676-2678	1-3/ 4
A	SHINOZUKA K., et al., "Characterization of prejunctional purin oceptors on adrenergic neres of the rat caudal artery", Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol. 338 (1988) p. 221-227	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.06.99

国際調査報告の発送日

29.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492